

In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful



### Copyright disclaimer

"La faculté" is a website that collects copyrights-free medical documents for non-lucrative use.

Some articles are subject to the author's copyrights.

Our team does not own copyrights for some content we publish.

"La faculté" team tries to get a permission to publish any content; however, we are not able to contact all the authors.

If you are the author or copyrights owner of any kind of content on our website, please contact us on:  
facadm16@gmail.com

All users must know that "La faculté" team cannot be responsible anyway of any violation of the authors' copyrights.

Any lucrative use without permission of the copyrights' owner may expose the user to legal follow-up.



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de  
la Recherche Scientifique**



**UNIVERSITE D'ALGER 1**

**FACULTE DE MEDECINE  
D'ALGER**



**POLYCOPIE POUR**  
**1<sup>ère</sup> ANNEE MEDECINE**  
**ET**  
**MEDECINE DENTAIRE**

**ENZYMOLOGIE**

**Auteurs :**

- Dr GHOUALI A.M
- Dr MOUSSAOUL.
- Dr SOBHI.
- Dr KASSOUL.
- Pr AIT ABDELKADER Bélaïd
- Pr CHIKOUCHE Ammar
- Pr GRIENE Lakhdar

# ENZYMOLOGIE

## INTRODUCTION

- Le déroulement rapide et efficace des réactions biochimiques doit se faire en présence de **Biocatalyseurs**.
- Certaines protéines sont douées d'activité catalytique spécifique ; il s'agit des **enzymes**, ces dernières occupent une place importante dans le métabolisme intermédiaire en assurant le déroulement ordonné et régulé des processus physiologiques et maintenir leur homéostasie.
- L'étude de la structure, des caractéristiques et de la cinétique des enzymes est indispensable pour la compréhension des activités enzymatiques.

## I- GENERALITES ET DEFINITIONS

### 1- Les enzymes

- Sont pour la plupart des protéines globulaires capables de catalyser des réactions chimiques (Biocatalyseurs) dans les conditions compatibles avec la vie ( Température ,Pression et concentration)
  - Catalyseurs: agissent à faible concentration et augmentent les vitesses des réactions chimiques de plusieurs ordres de grandeur sans être eux-mêmes modifiés.
  - Biologiques : produits par la cellule , toutes les enzymes sont des protéines sauf les ribozymes (ARN catalytiques)
- Elles interviennent dans diverses réactions de dégradation, ou de synthèse.

### 2- Substrat

Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.

### 3- Produit

Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. Cette molécule résulte de la transformation du substrat.

### 4- Ligand

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme. Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

## 5- Cofacteur

- Certaines enzymes sont actives par elles mêmes, sans autres groupes fonctionnels, D'autres au contraire nécessitent la présence d'un composé non protéique appelé **Co-facteur** (*Fig 1*)
- Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :
  - Pour transporter ou compléter un substrat ;
  - Pour accepter un produit ;
  - Comme participant à la structure de l'enzyme.
- Les cofacteurs peuvent être :
  - Des ions appelés ions métalliques activateurs, Ex :  $Zn^{2+}$  de l'anhydrase carbonique.
  - Des molécules organiques complexes synthétisées par les cellules vivantes ou apportées par l'alimentation (Vitamines) appelés coenzymes, sont de deux types :
    - ✓ Les coenzymes **libres** :
      - Interviennent dans la réaction de manière **stœchiométrique** ; se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée ;
      - Forment de **faibles** liaisons avec l'enzyme ;
      - Leur concentration est du même ordre de grandeur que celle du **substrat**.
    - ✓ Les coenzymes **liés** :
      - Interviennent dans la réaction de manière **catalytique** ils ne se dissocient pas de l'enzyme ;
      - Forment de **fortes** liaisons avec l'enzyme ;
      - Leur concentration est du même ordre de grandeur que celle de l'**enzyme**.

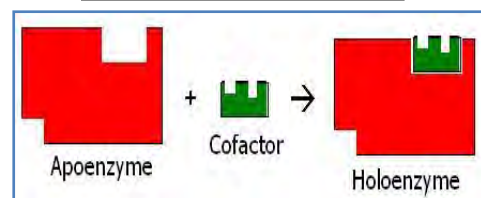
Le terme **Holoenzyme** désigne le complexe enzymatique catalytiquement activé par ses cofacteurs (*Fig2*)

- La partie protéique de l'enzyme est alors nommée **Apoenzyme**
- Et la partie non protéique : **Coenzyme**

**Figure1 : Exemples de Cofacteurs**

Principaux cofacteurs enzymatiques	
cofacteur	Enzyme
<b>Coenzyme</b>	
Thiamine pyrophosphate	Pyruvate déshydrogénase
Flavin adenine nucleotide	Monoamine oxydase
Nicotinamide adenine dinucleotide	Lactate déshydrogénase
Pyridoxal phosphate	Glycogen phosphorylase
Coenzyme A (CoA)	Acetyl CoA carboxylase
Biotin	Pyruvate carboxylase
5'-Deoxyadenosyl cobalamin	Méthylmalonyl mutase
Tetrahydrofolate	Thymidylate synthase
<b>Metal</b>	
$Zn^{2+}$	Carbonic anhydrase
$Zn^{2+}$	Carboxypeptidase
$Mg^{2+}$	EcoRV
$Mg^{2+}$	Hexokinase
$Ni^{2+}$	Urease
Mo	Nitrate reductase
Se	Glutathione peroxidase
Mn	Superoxyde dismutase
K <sup>+</sup>	Propionyl CoA carboxylase

**Figure 2 : Holoenzyme**



## II-STRUCTURE DES ENZYMES

- Les enzymes sont des protéines globulaires, elles adoptent plusieurs degrés d'organisation (*Fig 3*):

➤ **Structure primaire :** la séquence en acides aminés.

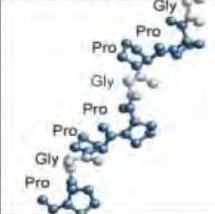


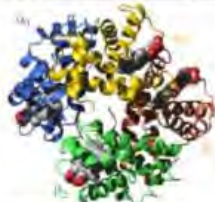
➤ **Structure secondaire :** la séquence des acides aminés subit des repliements pour former des motifs (hélices  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ ).

➤ **Structure tertiaire :**

- ✓ Association de plusieurs motifs, donnant une forme spatiale à la protéine.
- ✓ Cette organisation entraîne une localisation:
  - Des acides aminés **polaires** en surface externe ;
  - Les acides aminés **non polaires** vers l'intérieur de la molécule (zone hydrophobe interne) .C'est au niveau de cette zone que se situe le **site actif** d'une enzyme.
- ✓ Pour qu'une enzyme soit fonctionnelle, il faut qu'elle adopte une structure tertiaire.

➤ **Structure quaternaire :**

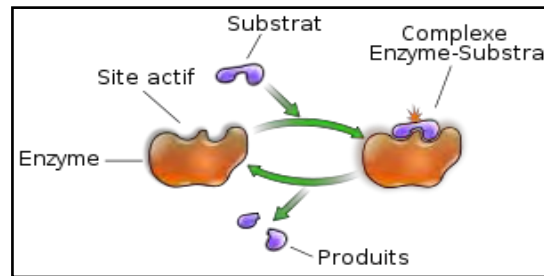
- ✓ Association de plusieurs chaînes protéiques en un oligomère ;
- ✓ Cette structure est adoptée par les **enzymes régulatrices**.

Structure primaire	Structure secondaire	Structure tertiaire	Structure quaternaire
			
La structure primaire est la séquence des acides aminés.	Les structures secondaires sont les motifs que forment les acides aminés. On reconnaît principalement les structures en hélice $\alpha$ et en feuillet $\beta$ .	La structure tertiaire se rapporte aux relations dans l'espace des différentes structures secondaires, hélices et feuillets.	Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation : on parle de structure quaternaire.

**Figure 3 : Différents niveaux structuraux des protéines enzymatiques**

- Le site actif :**

- Le site actif (SA) est une zone privilégiée, qui a la forme d'une cavité, située dans la zone interne hydrophobe de la protéine, au niveau de laquelle s'exerce électivement le pouvoir catalytique de l'enzyme (*Fig 4*).
- Il est subdivisé en 2 parties :
  - ✓ **Site de liaison, fixation, et reconnaissance :** Reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme.
  - ✓ **Site catalytique :** Permet la réaction transformant le substrat en produit.



**Figure 4: Le site actif**

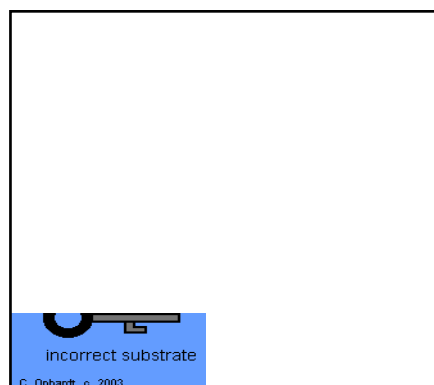
➤ Il comprend 3 types d'acides aminés :

- ✓ **Acides aminés contributeurs** : Permettent à la protéine enzymatique d'adopter une conformation spatiale pour que le ligand puisse s'y adapter.
- ✓ **Acides aminés auxiliaires** : Assurent la mobilité des zones situées au voisinage du centre actif.
- ✓ **Acides aminés de contact** : - Lieu de la réaction enzymatique.  
- Fait intervenir des groupements particuliers de ces AA de contact, qui interagissent avec un ou plusieurs groupements particuliers du substrat.

- La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au niveau du SA.
- Le SA doit être dans une conformation spatiale de telle sorte que le substrat puisse s'y fixer, il existe différents modèles :

#### **Modèle de Fisher (1980) : Clé-serrure**

- Dans ce modèle, la formation du complexe enzyme-substrat **ES** nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels ou domaines du substrat avec des motifs de la cavité enzymatique (*Fig 5*).
- Ce modèle explique la spécificité de l'enzyme pour son substrat, mais il n'explique pas l'effet des effecteurs.

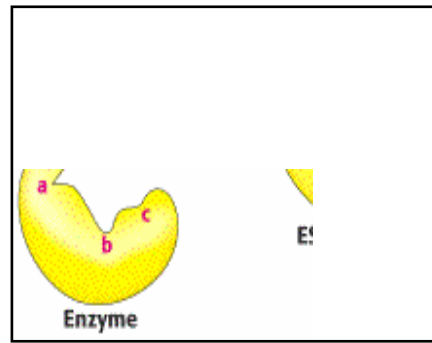


**Figure 5 : Modèle de Fisher**



### Modèle de Koshland(1985) : Ajustement induit

L'association enzyme-substrat est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat (*Fig 6*)



*Figure 6 : Modèle de Koshland*

### III-PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES ENZYMES

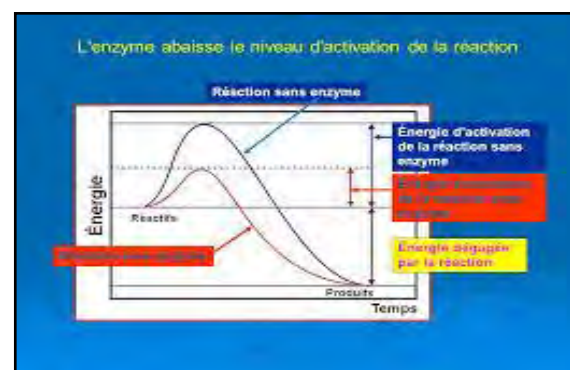
Les enzymes possèdent des caractéristiques qui les rendent uniques.

#### 1- Propriétés d'un catalyseur chimique:

- Augmente la vitesse d'une réaction, mais ne provoque pas de réaction, ou rend possible une réaction qui ne l'est pas sur le plan thermodynamique (*tableau 1*);
- Diminue l'énergie d'activation (*Fig 7*);
- Se trouve intact à la fin de la réaction;
- Au cours des réactions chimiques réversibles, le catalyseur accélère de la même manière les 2 vitesses de réaction évoluant simultanément en sens inverse;
- Il ne modifie pas l'équilibre final de la réaction.

Cyclophilin	$10^5$
Carbonic anhydrase	$10^7$
Triose phosphate isomerase	$10^9$
Carboxypeptidase A	$10^{11}$
Phosphoglucomutase	$10^{12}$
Succinyl-CoA transferase	$10^{13}$
Urease	$10^{14}$
Orotidine monophosphate decarboxylase	$10^{17}$

*Tableau 1*



*Figure 7 : Énergie d'activation avec et sans enzyme*

Toutes ces caractéristiques sont applicables aux enzymes, mais les enzymes sont **plus efficaces** que les catalyseurs

- Agissent à très faible concentration;
- Abaissent l'énergie d'activation d'une manière plus importante qu'un catalyseur.

## 2- Spécificité des enzymes :

Les enzymes sont hautement spécifiques :

- **Spécificité d'action:** l'enzyme ne catalyse, pour un substrat donné, qu'un seul type de réactions
  - ✓ Kinases : Ne catalysent que les réactions de phosphorylation en présence d'ATP ;
  - ✓ Décarboxylases : catalysent la décarboxylation des molécules contenant un groupement carboxyle.
- **Spécificité de substrat:** l'enzyme agit sur un substrat ou une classe de substrats, on distingue :
  - ✓ Spécificité **absolue** : l'enzyme n'agit que sur un substrat unique. Exemple : Glucokinase : ne phosphoryle que le glucose.
  - ✓ Spécificité **large** : l'enzyme agit sur plusieurs substrats d'une même classe. Exemple : Hexokinase : phosphoryle divers hexoses, dont le glucose.

La spécificité d'une enzyme est due à son site actif.

## 3- Nature protéique:

Toutes les enzymes sont des protéines sauf les ribozymes, et de ce fait elles se dénaturent sous l'effet de la chaleur.

## 4- Régulables:

Certaines enzymes modifient leurs activités catalytiques en réponse à des signaux métaboliques, ce qui permet l'ajustement de l'offre métabolique à la demande cellulaire.

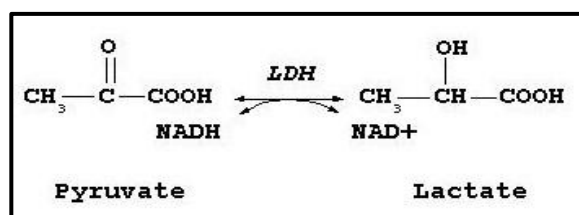
Exemple: La phosphofructokinase: activée par l'AMP et inhibée par l'ATP.

Cette modulation active ou inhibe la glycolyse selon que la charge énergétique est faible ou élevée.

## 5- Variétés moléculaires :iso-enzymes

- Les isoenzymes catalysent la même réaction sur le même substrat.
  - Les isoenzymes diffèrent par certaines de leurs propriétés:
    - ✓ Physico-chimiques ( pH, mobilité électrophorétique, Température ) ;
    - ✓ Cinétique ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) ;
    - ✓ Sensibilité à certains effecteurs (activateurs, inhibiteurs) ;
    - ✓ Répartition dans les différents tissus de l'organisme.
- ⇒ La mesure de l'activité d'une iso-enzyme renseigne sur l'état du tissu dont elle est spécifique.
- Cette différence est due à des variations au niveau de leurs structures primaires (Séquence en acides aminés similaires mais non identique)



**Exemple : Lactate déshydrogénase(LDH)**

*Réaction catalysée par la LDH*

Tétramère : 2 protomères différents ; H (muscle cardiaque) et M (muscle squelettique et foie).

L'association de protomères conduit à 5 iso-enzymes différents :

- LDH1 (**H4**): Cœur.
- LDH2 (**H3M1**): érythrocytes.
- LDH3 (**H2M2**): Leucocytes, rate, et ganglions.
- LDH4 (**H1M3**): muscle utérin, poumon.
- LDH5 (**M4**): Foie.

#### **IV- NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION DES ENZYMES**

De nombreuses enzymes ont été découvertes au cours de ces dernières années, se pose alors le problème de leur classification et de leur dénomination ;

- Certaines enzymes sont désignées par un ancien nom consacré par l'usage ,Ex :pepsine, trypsine ...
- Une nomenclature dans laquelle on utilise le suffixe "ase" est encore utilisée :
  - Soit en l'ajoutant au substrat : uréase, phosphatase ;
  - Soit au type de réaction catalysée : oxydase,hydrolase .
- Une classification plus rigoureuse à toutefois été proposée pour nommer de façon non ambiguë toutes les enzymes connues et non encore connues : c'est la **Nomenclature officielle**, Chaque enzyme se voit attribué :
  - Un numéro de code ;
  - Un nom systématique ;
  - Un nom commun recommandé.

#### **Le numéro de code :**

Chaque enzyme est assigné à quatre chiffres par la commission des enzymes (EC) de l'union internationale de Biochimie Moléculaire (EC W.X.Y.Z)

Le numéro de code spécifie :

- Le 1<sup>er</sup> chiffre : la classe de l'enzyme (*Tableau 2*) ;
- Le 2<sup>ème</sup> chiffre : la sous classe, la nature du groupement chimique donneur de groupement, type de fonction du substrat métabolisé ;.
- Le 3<sup>ème</sup> chiffre : la sous-sous-classe, indique la nature chimique de l'accepteur ;

- Le 4<sup>ème</sup> chiffre : groupe, numéro d'ordre de l'enzyme (dans la sous sous classe).

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	 $A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	 $A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$	C <sub>1</sub> -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	 $A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	 $A + B \rightleftharpoons A-B$	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	 $A \rightleftharpoons \text{Iso-A}$	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	 $A + B + XTP \rightleftharpoons A-B + XDP + P_i$	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

Tableau 2

### Le nom systématique

Ce nom précise la nature du donneur, la nature de l'accepteur et le type de réaction catalysée.

### Le nom commun recommandé :

C'est l'appellation consacrée pour l'usage, désignée souvent sous forme d'abréviation.

Ex : Glucokinase (GK), Lactate déshydrogénase (LDH), Aspartate aminotransférase (ASAT)

Exemple d'enzyme : Glucokinase « GK » :

Le numéro de code : EC. 2.7.1.2

- 2 : transférase ;
- 7 : le groupement transféré est un phosphore ;
- 1 : l'accepteur est un groupement alcool (du glucose) ;
- 2 : le numéro d'ordre de la GK.

Le nom systématique : l'ATP, D-glucose 6-phosphotransférase.

Le nom commun : la Glucokinase.

## V- LA CINETIQUE ENZYMATIQUE

### 1- Définition :

C'est l'étude de la vitesse maximale d'une réaction catalysée par une enzyme et ses modifications en réponse aux changements des conditions environnementales (des conditions expérimentales).

Les intervenants d'une réaction enzymatique :

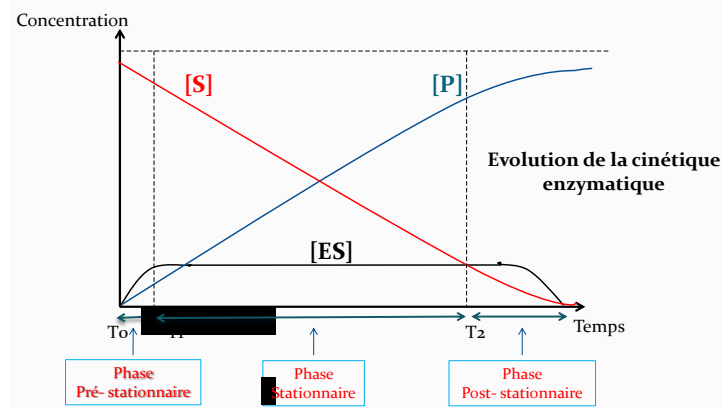


### 2- Les différentes phases de la réaction enzymatique

- Soit la réaction:



**Figure 8 : Les différentes phases de la réaction enzymatique**



Différentes phases	Pré-stationnaire	Stationnaire	Post-stationnaire
<u>Caractéri-</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzyme mise en présence d'excès de substrat.</li> <li>- Combinaison ES très rapide.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzyme saturée par le substrat.</li> <li>- Combinaison ES est à concentration maximale Constante.</li> <li>- Vitesse de la réaction est constante: <b>Vitesse initiale</b> (Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme.</li> </ul>

- **Notion d'ordre:**

Décrit les variations de la vitesse en fonction de la concentration des réactants

- **Forte concentration de S :** La vitesse de la réaction est indépendante de la concentration en substrat:  
**Réaction d'ordre 0**
- **Faible concentration de S:** La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en substrat:  
**Réaction d'ordre 1**

⇒ **Travailler en concentration saturante en substrat**

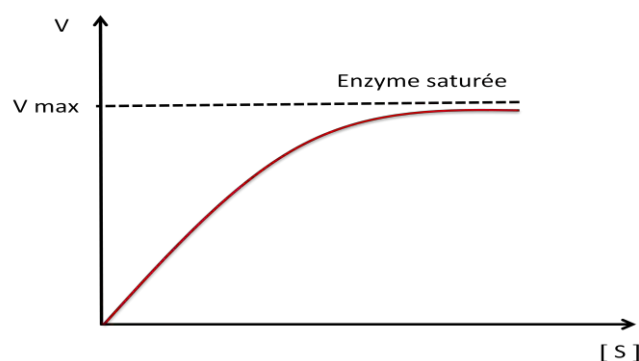
### **3- La vitesse de la réaction enzymatique**

S'exprime par: la quantité de substrat transformé (dS) par unité de temps (dt) Ou par la quantité de produit (dP) formé par unité de temps (dt) (Dans les conditions optimales).

$$V = - dS / dt = dP / dt$$

### **4- Notion de Vitesse initiale :**

En catalyse enzymatique la vitesse initiale croît avec la concentration initiale de S jusqu'à  $V_{max}$  (saturation de l'enzyme par S) (Fig 9)



**Figure 9 : Courbe de saturation**

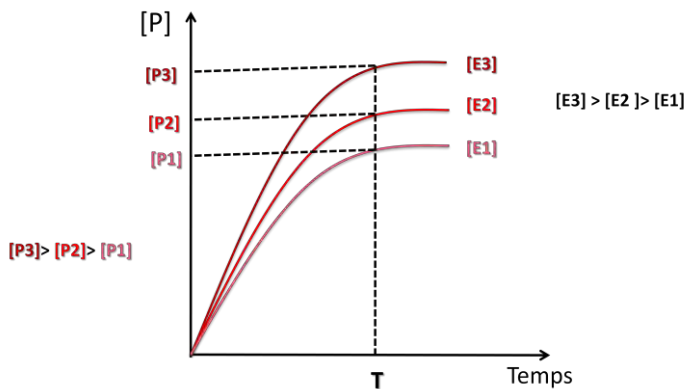
- La vitesse initiale est la vitesse tout au début de la réaction ;
- La phase initiale (pré-stationnaire) est très brève=> vitesse initiale est la vitesse à la phase stationnaire ou l'enzyme est saturée par son substrat
- La vitesse étudiée est toujours la vitesse initiale.

### **5- Influence de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale**

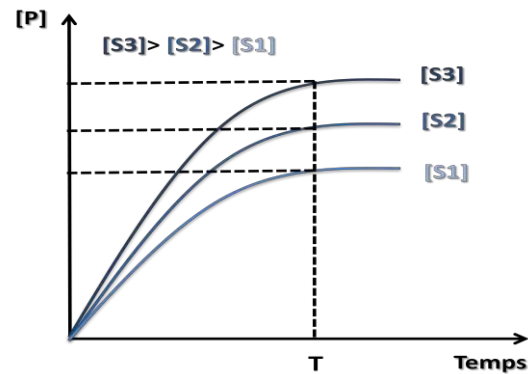
Lorsque la concentration de l'enzyme augmente=> la vitesse initiale augmente aussi (Fig10)

## 6- Influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale

Lorsque la concentration du substrat augmente  $\Rightarrow$  la vitesse initiale augmente aussi (Fig11).



**Figure 10 :** Influence de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale



**Figure 11 :** Influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale

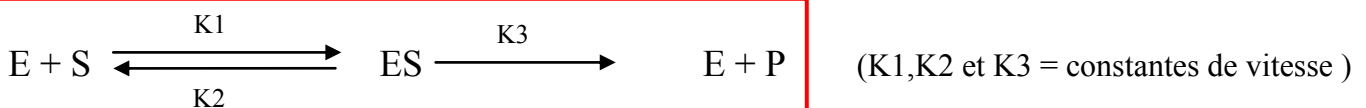
## VI. LA CINETIQUE MICHAELIENNE

### 1- Cinétique enzymatique à un substrat :

#### A- Etablissement de l'équation de Michaelis Menten :

➤ Elle nécessite plusieurs conditions :

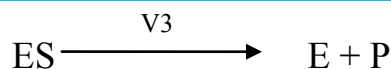
- La concentration du produit doit être négligeable par rapport à celle du substrat pour éviter la réaction inverse.
- La concentration du complexe ES doit être constante au cours du temps.



➤ Formation du complexe ES:



➤ Dissociation du complexe ES:



- Disparition de S.
- Apparition de P.
- Régénération de E.

- D'après la loi d'action de masse:

$$V_1 = k_1 [E][S] \dots\dots (1)$$

$$V_2 = k_2 [ES] \dots\dots (2)$$

- Vitesse d'apparition des produits:

$$dP/dt = V_3 = k_3 [ES] \dots\dots (3)$$

- La vitesse de disparition du substrat est égale à la vitesse d'apparition du produit

$$- dS/dt = dP/dt \dots\dots (4)$$

- La vitesse de disparition du substrat

$$- dS/dt = V_1 - V_2 \dots\dots (5)$$

$$V_1 - V_2 = V_3$$

$$\text{Et selon (1),(2),(3),(4) et (5): } k_1 [E][S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_m$$

**$K_m$** : constante de dissociation du complexe ES = **constante de Michaelis**

Valeur de  $K_m$  est d'autant plus élevée que la dissociation du complexe ES est forte et donc que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible

$[Et]$ : Concentration de l'enzyme présente dans le système

$$[E] = [Et] - [ES]$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([Et] - [ES])[S]}{[ES]}$$

$$K_m + [S] = \frac{[Et][S]}{[ES]} \quad [ES] = \frac{[Et][S]}{K_m + [S]}$$

$V$  = vitesse de la réaction enzymatique =  $V_3$

$$V = V_3 = k_3 [ES]$$



$$V = \frac{k_3 \cdot [Et] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

➤ La vitesse de la réaction dépend de la:

- Concentration en enzyme totale
- Concentration en substrat
- De la constante de Michaelis

La vitesse est maximale lorsque [ES] sera la plus grande possible: Lorsque la totalité de l'enzyme sera combiné au substrat

$$[Et] = [ES] \quad V_m = k_3 \cdot [Et]$$



Equation de Michaelis-Menten

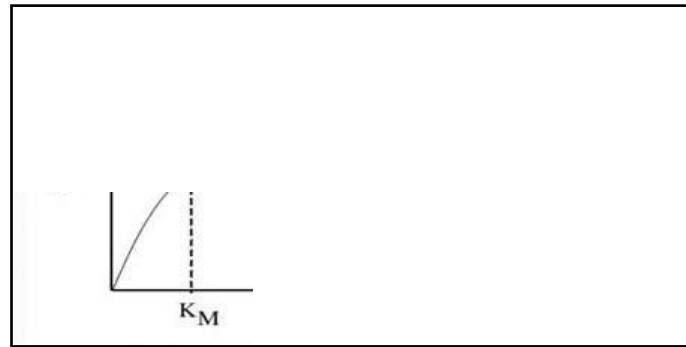
### b-Signification de la vitesse maximale $V_{max}$ et de la constante de Michaelis –Menten $K_m$

➤  $V_{max}$ :

- Correspond à la vitesse initiale quand l'enzyme est saturée par son substrat ;
- Renseigne sur **l'efficacité catalytique** de l'enzyme  $V_{max} = k_3 [Et]$   $\Rightarrow V_{max} = k_{cat}[Et]$
- $k_{cat}$  : Turn Over Number « **TNO** », nombre de molécules de substrat transformé en produit par unité de temps, c'est **l'efficacité catalytique** de l'enzyme : la fréquence de l'activité catalytique ( $S^{-1}$ ).

➤  $K_m$ :

- **Affinité** de l'enzyme pour le substrat,  $K_m$  est d'autant plus élevé que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est plus faible (inversement proportionnelle à l'affinité).
- Concentration initiale de substrat pour laquelle  $V_i = 1/2 V_{max}$ , donc la moitié des sites actifs de l'enzyme est occupée par le substrat.
  - Quand  $[S] \gg K_m$   $V_i = V_{max} = k_{cat}[Et]$
  - Quand  $[S] \ll K_m$   $V_i = (k_{cat}/K_m) [Et] [S]$



**Figure 12 : Hyperbole de Michaelis**

$k_{cat}/K_m$  : constante de spécificité liée au substrat, permet de déterminer le meilleur substrat pour une enzyme.

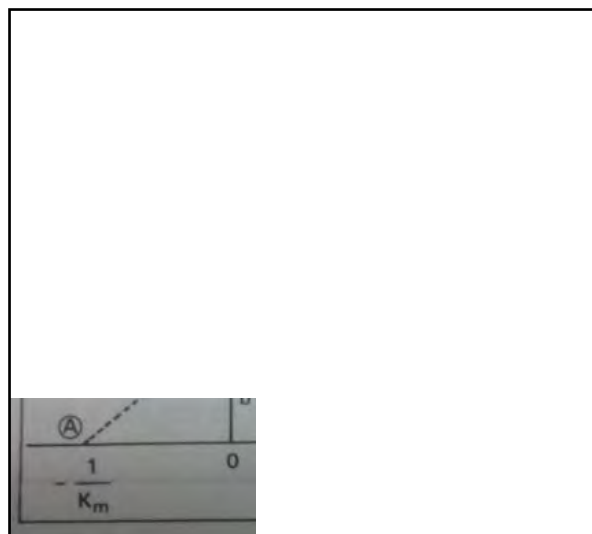
### **c- Détermination de la constante de Michaelis :**

#### ➤ **Méthode arithmétique:**

$$V = V_{max}/2 \text{ } K_m = [S]$$

#### ➤ **Méthode graphique de Line weaver et Burk:**

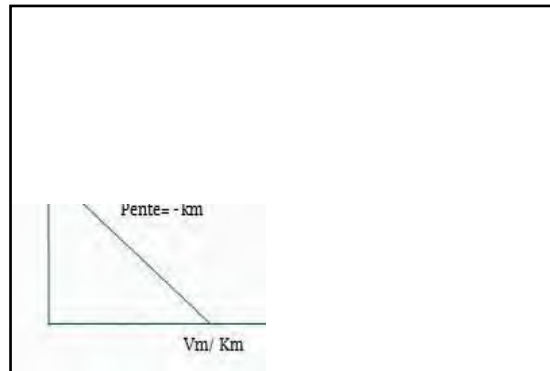
C'est l'équation d'une droite sous forme :  $y = ax + b$  Ou  $1/V = f(1/[S])$  ou :  $a = K_m/V_{max}$  ,  $b = 1/V_{max}$



**Figure 13 : représentation en double inverse de Lineweaver et Burk**

- Pour  $1/V = 0 \Rightarrow 1/[S] = -1/K_m$  .....point (A)
- Pour  $1/V = 2/V_{max} \Rightarrow 1/[S] = 1/K_m$  ..... point (B)

➤ **Méthode graphique d'Eadie Hofstee:**



**Figure 14 : représentation en double inverse d'Eadie Hofstee**

**d- Détermination de l'activité enzymatique**

- La détermination la plus utilisée est la mesure cinétique : en mesurant la disparition du substrat ou l'apparition du produit en fonction du temps.
- Cette mesure est possible par la mesure de la variation d'absorbance  $\Delta DO$ . L'absorbance est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$Do = \epsilon \cdot C \cdot l \quad C = Do \cdot 1 / \epsilon \cdot 1 / l$$

$$\text{Activité enzymatique en UI/l} = (\Delta Do / \Delta t) \cdot (1 / \epsilon) \cdot (1 / l) \cdot (Vt / Ve) \cdot 10^6$$

$\Delta t$ : temps de mesure en min

$\epsilon$ : coefficient d'absorption molaire ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$l$ : trajet optique = 1 cm

$Vt$ : volume du mélange réactionnel total ou se fait la mesure

$Ve$  : volume du milieu contenant l'enzyme à doser

**e- Unités enzymatiques**

C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une certaine quantité de substrat par unité de temps

➤ **L'unité internationale « UI »**

C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une **micromole** de substrat par **minute** dans les conditions optimales de mesure

$$UI = \mu \text{ mol/min}$$

- **Le katal « kat »** : la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une **mole** de substrat par **seconde**.

$$Kat = \text{mol/sec}$$

- **L'activité enzymatique spécifique** : Nombre de molécules de substrat transformées par **min** et par **milligramme de protéine** enzymatique

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\text{mg de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\text{mg de protéine}}$$

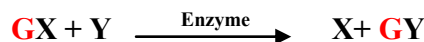
Mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

- **Activité spécifique moléculaire**: Nombre de molécules de substrat transformées par **min** et par **molécule** d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\mu \text{ mol de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\mu \text{ mol de protéine}}$$

## 2- **Cinétique enzymatique à deux substrats** :

- L'étude des mécanismes à 2 substrats, se fait par la généralisation des notions établies pour les réactions à 1 substrat.
- Les enzymes adoptant ce model cinétique catalysent généralement un transfert de groupement G



- **GX** : 1<sup>er</sup> substrat      - **X**: 1<sup>er</sup> produit  
 - **Y**: 2<sup>e</sup> substrat      - **GY** : 2<sup>e</sup> produit

- Cette cinétique à 2 substrats implique différents mécanismes, qui peuvent être:

- Séquentiels :
  - Ordonnés
  - Aléatoires
- Ping pong

### **a-Mécanisme séquentiel (à complexe ternaire/ à transfert simple)**

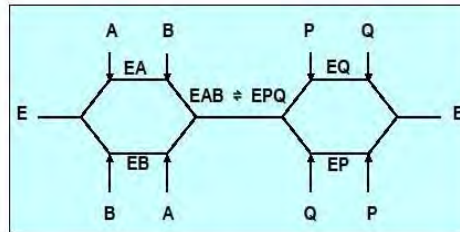
- Appellation due à la formation d'un complexe ternaire: [**Enzyme-1<sup>er</sup> Substrat -2eme Substrat** ] (**E-GX-Y**)
- La réaction est dite à **transfert simple**, car le groupement passe du **substrat donneur (GX)** au **substrat accepteur (Y)**.
- Dans ces réactions **tous les substrats doivent se fixer sur l'enzyme**, avant qu'aucun produit ne soit libéré.

- Selon l'existence d'un **ordre précis** de fixation des substrats, ou de libération des produits, on distingue 2 mécanismes:

- Bi-Bi aléatoire
- Bi-Bi ordonné

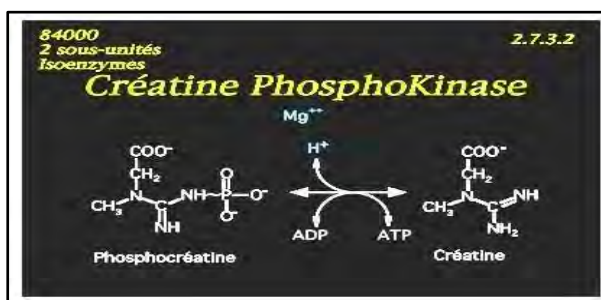
### ➤ Bi-Bi aléatoire

Aucun ordre n'est observé dans ce type de mécanisme, la fixation des substrats se fera aléatoirement, il en est de même pour la libération des produits.



**Figure 15 :** Cinétique à 2 substrats ,mécanisme BiBi aléatoire

Exemple de mécanisme Bi Bi aléatoire :



Catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat: phospho-créatine, vers l' ADP (co-enzyme transporteur)

L'affinité de l'enzyme pour ces 2 substrats étant voisine

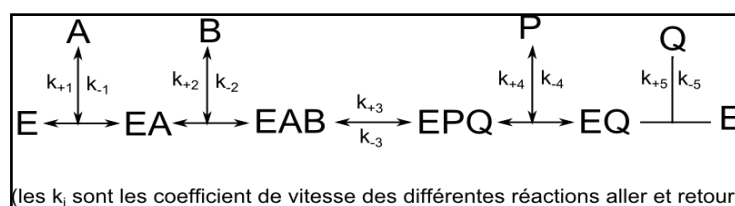
### ➤ Bi-Bi ordonné

Il y a fixation de

- 1- Substrat A
  - 2- Puis Substrat B
- } Donnant naissance à EAB

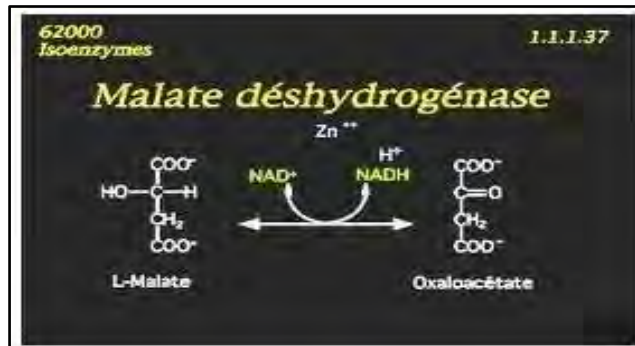
La suite de la réaction conduit à la libération de

- 1- 1<sup>er</sup> Produit P (Issu de B)
- 2- ensuite 2<sup>nd</sup> Produit Q (Issu de A)



**Figure 16 :** Cinétique à 2 substrats ,mécanisme BiBi ordonné

## Exemple de mécanisme Bi Bi ordonné



L'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate, si elle n'est pas préalablement associée au  $\text{NAD}^+$  (co-enzyme)

## b. Réaction type Ping-pong (à complexe binaire)

- Un ou plusieurs produits sont libérés par l'enzyme, avant que tous les substrats ne soient fixés.
- Il y a formation d'un complexe binaire

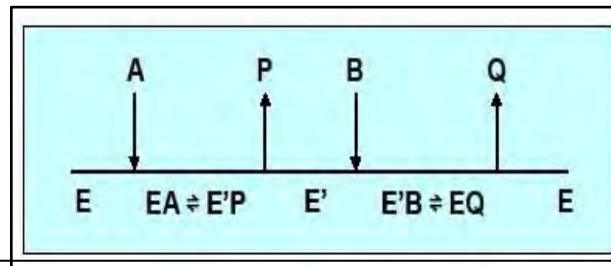
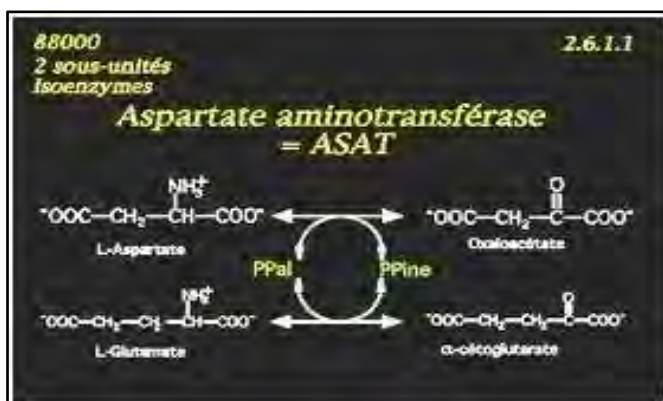


Figure 17: Cinétique à 2 substrats ,mécanisme Ping-pong

## Exemple de mécanisme Ping-pong



### 1- Fixation du 1<sup>er</sup> Substrat: L-Aspartate

Départ du ( $-\text{NH}_2$ ) et sa fixation du PLP (co-enzyme) qui se transforme en phosphate de pyridoxamine

### 2- Libération du 1<sup>er</sup> Produit: Oxalo-acétate

### 3- Fixation du 2<sup>ème</sup> substrat: $\alpha$ céto-glutarate

Transfert du groupement ( $-\text{NH}_2$ ) du phosphate de pyridoxamine vers l' $\alpha$ -céto-glutarate

### 4- Libération du 2<sup>ème</sup> produit: L-glutamate



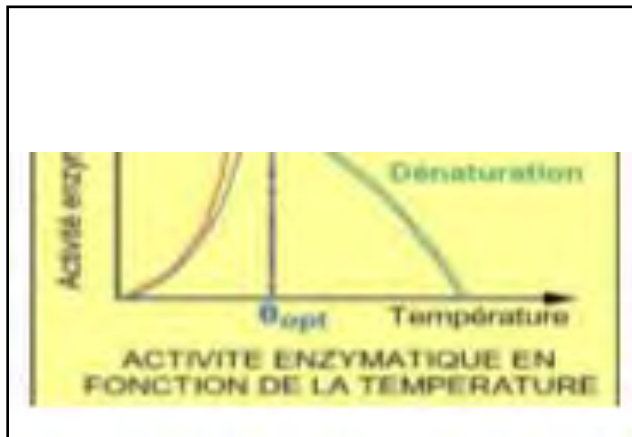
## VII. LES FACTEURS INFLUENÇANT LA REACTION ENZYMATIQUE

### 1-Influence des agents physiques

#### a-Influence de la température

2 effets sur la réaction enzymatique:

- Elle accélère la réaction en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.
- Une température élevée fragilise les liaisons et rend la structure tertiaire instable, avec dénaturation la protéine  $\Rightarrow$  Il y aura diminution de l'activité catalytique.

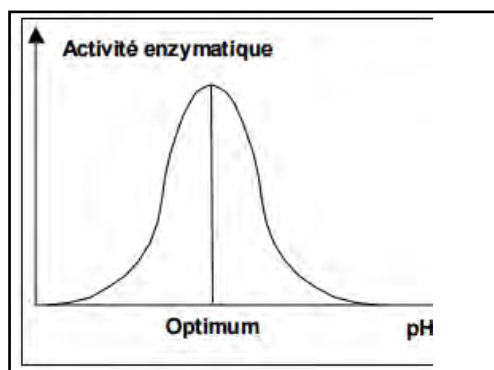


- L'activité enzymatique augmente jusqu'à une **température optimale** puis diminue pour atteindre une activité nulle à de grandes températures.
- A la température optimale l'activité enzymatique est **la plus importante**.
- Cette température optimale **varie d'une enzyme à un autre**.

**Figure 18** : Influence de la température sur l'activité enzymatique

#### b-Influence du pH

- Le pH joue sur l'ionisation des molécules  $\Rightarrow$  Modification de la conformation de l'enzyme et du substrat



- Aux valeurs extrêmes : dénaturation de la protéine enzymatique.
- Aux valeurs intermédiaires : modification de la conformation du site actif et celle de substrat.
- **pH optimum** : activité enzymatique est optimale.

**Figure 19** : Influence du pH sur l'activité enzymatique

### **c-Force ionique:**

La présence d'ions dans le milieu réactionnel joue un rôle important:

- Certaines enzymes nécessitent des activateurs (ions métallique).
- Solubilité maximale pour une concentration faible en sels neutres.

### **d-Effet des radiations:**

- Les émissions radioactives  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , rayons X, et les neutrons.
- Peuvent directement ou indirectement entraîner l'**inactivation des enzymes**:

#### ✓ **Effet Direct:**

Ionisation des molécule.

#### ✓ **Effet Indirect:**

- Ionisation du milieu réactionnel.
- Formation de radicaux libres qui attaquent les enzymes.

## **2-Influence des agents chimiques**

### **Un effecteur:**

- Est tout corps chimique, minéral ou organique capable de modifier la cinétique des réactions enzymatiques.
- Il peut être soit activateur ou inhibiteur.

### **a-Activateurs enzymatiques :**

Est tout agent chimique, qui par sa liaison avec l'enzyme accélère la vitesse de la réaction enzymatique.

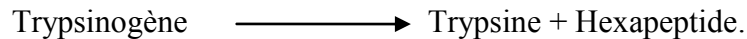
#### ➤ **Ions métalliques:**

- Se fixent par coordinance à des atomes d'oxygène des groupements COOH, et d'azote des groupements NH<sub>2</sub> des enzymes
- Ils confèrent une grande stabilité dans le site actif de l'enzyme
- L'ion métallique favorise:
  - Une bonne conformation de l'enzyme
  - La fixation du substrat
  - participe de manière directe à la catalyse

Exemple: Kinases activées par Mg<sup>+2</sup>

➤ **Activation des pro-enzymes inactifs:**

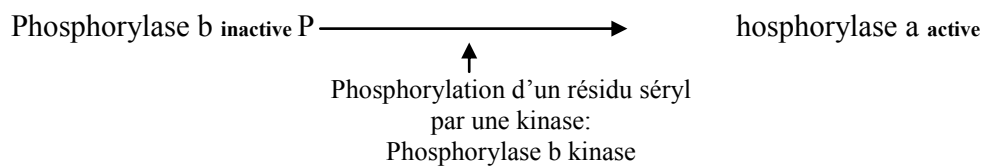
La plupart des enzymes protéolytiques sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs, L'élimination d'une séquence d'acides aminés par clivage spécifique le rend actif (permettant l'apparition du site actif).



➤ **Activation par fixation covalente d'un groupement chimique:**

L'enzyme peut exister entre deux formes interconvertibles, l'une active et l'autre non-active.

ex : phosphorylation et déphosphorylation.



**b-.Les inhibiteurs enzymatiques :**

- Est tout effecteur, qui par sa liaison avec l'enzyme **ralentit** la vitesse de la réaction enzymatique

- **Intérêt:**

- Mécanisme essentiel de contrôle des systèmes biologiques .
- Source d'information sur le mécanisme d'action des enzymes .

➤ **Les inhibiteurs irréversibles:**

- Se lient de façon irréversible avec l'enzyme
- Agissent brutalement en dénaturant l'enzyme
- **Exemple:** 5Fluoro-uracile utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse  
Inhibe la **thymidilate synthase**; enzyme qui intervient dans la synthèse de la thymine (ADN)  
Arrêt de la multiplication des cellules tumorales

➤ **Les inhibiteurs réversibles:**

- Perturbent la cinétique et peuvent stopper la réaction
- L'inhibition peut être levée dans des conditions réactionnelles particulières
- Ont un grand intérêt puisqu'ils permettent une étude très fine des mécanismes moléculaire de la catalyse.

✓ **Les inhibiteurs compétitifs:** ( Fig 20 A)

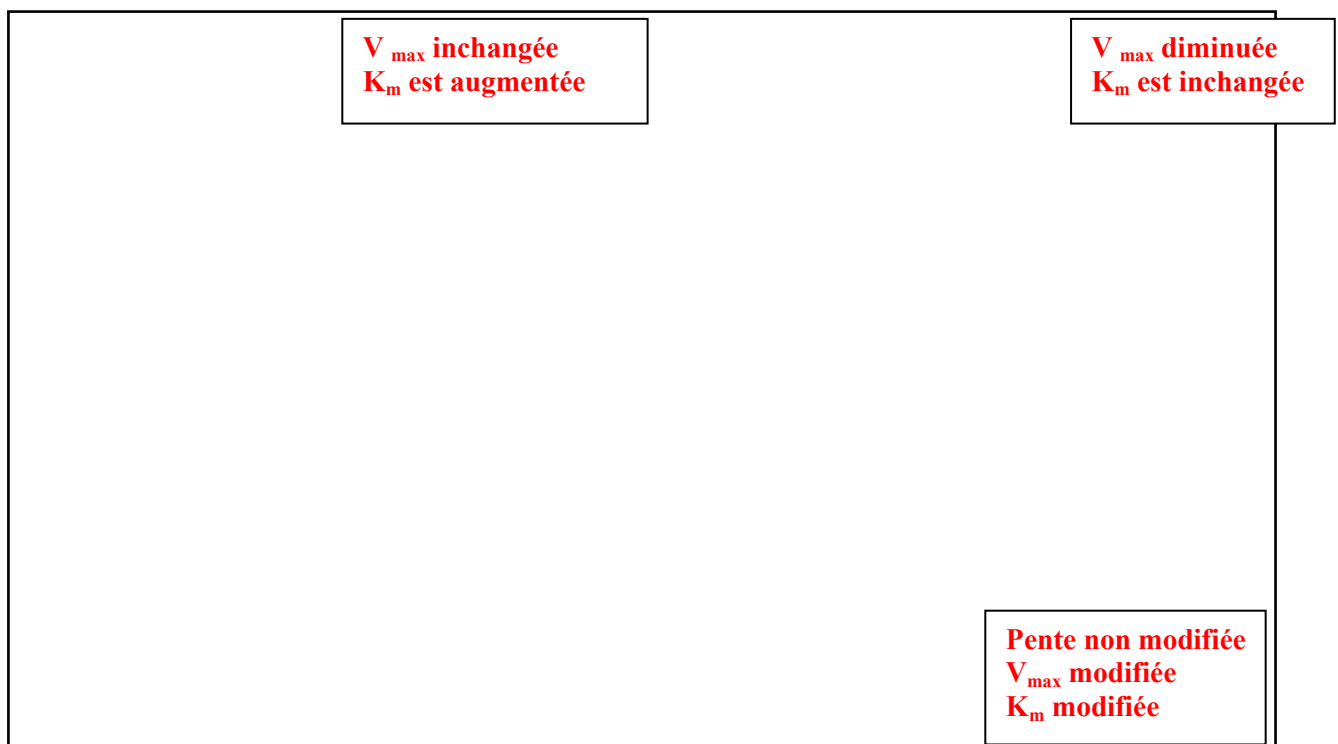
- Comportent une analogie structurale avec le substrat
- Entre en compétition avec les molécules de substrat pour se lier au site actif
- Se lie de façon réversible
- Diminuent la vitesse de catalyse en abaissant la proportion de molécules d'enzyme liées au substrat
- A concentration élevée en substrat, le substrat entre en compétition avec les molécules inhibitrices pour se lier au SA, et les déplacés des centres catalytique

✓ **Les inhibiteurs non compétitifs:** : ( Fig 20 B)

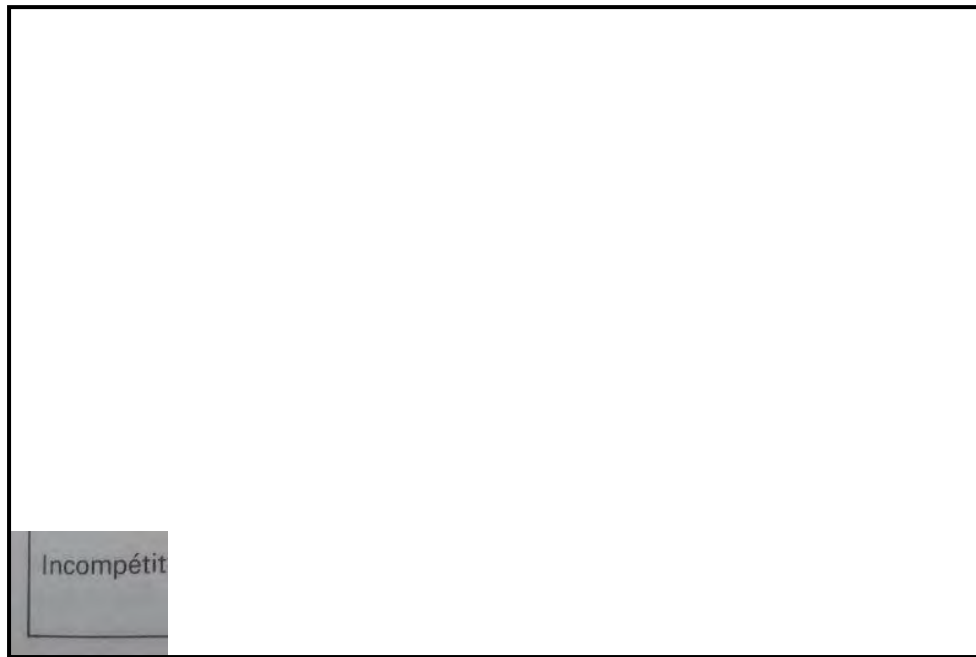
- Se lient de façon réversible à un site autre que le site actif.
- Il provoque une modification de la conformation de l'enzyme.
- L'enzyme peut se lier:
  - l'inhibiteur ;
  - au substrat ;
  - à l'inhibiteur et au substrat à la fois .
- L'enzyme est inactivée quand l'inhibiteur est lié, en présence ou non du substrat.
- L'effet de l'inhibiteur n'est pas inversé par l'augmentation de la concentration en substrat.
- L'inhibiteur diminue la concentration de l'enzyme active

✓ **Les inhibiteurs incompétitifs:** : ( Fig 20 C)

L'inhibiteur ne se lie pas à l'enzyme libre, mais uniquement au complexe ES

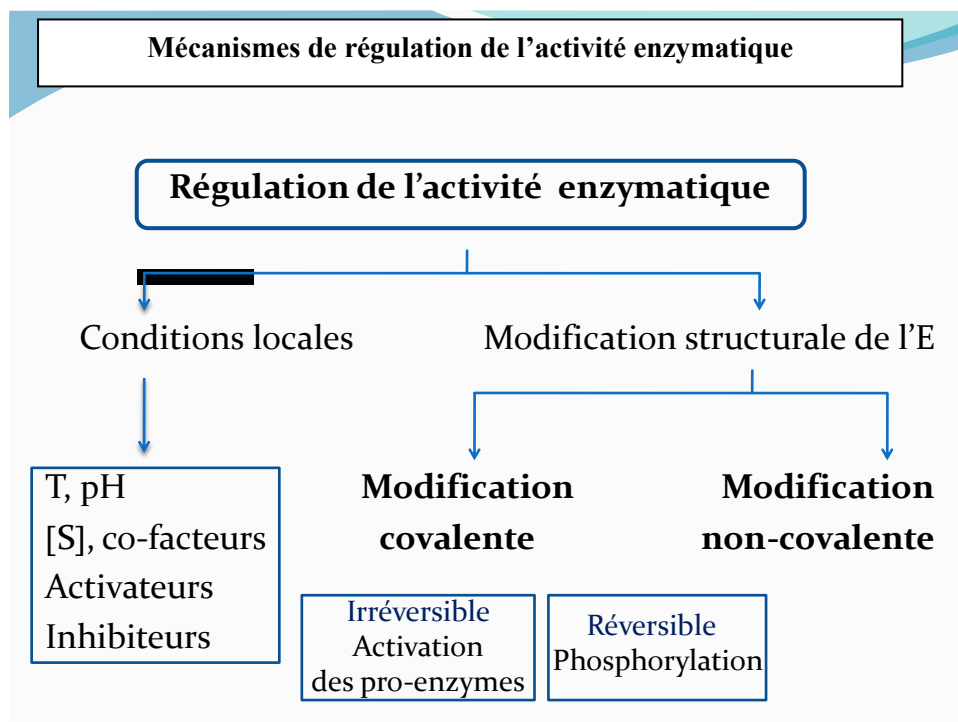


**Figure 20 :** Différents types d'inhibiteurs réversibles



**Tableau 3** : variations de  $V_{max}$  et  $K_m$  en fonction du type d'inhibiteur

## VIII-ENZYMES ALLOSTÉRIQUES



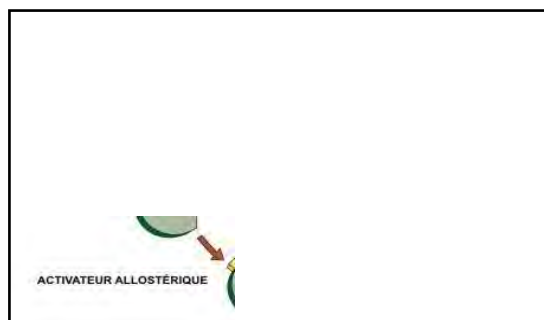
## 1-Définitions

### a- Allostérie:

- Propriété de certaines protéines actives, qui peuvent changer de conformation, lorsqu'elles se lient à un effecteur allostérique en un site différent du site actif.
- Cette liaison se traduit par une modification de l'activité.

### b- Régulation allostérique:

- Mécanisme de modulation de l'activité de certaines enzymes, employé par la cellule pour contrôler le flux global d'une voie métabolique.
- Les enzymes allostériques sont formées par plusieurs sous unités appelées: Protomères
- Ils contiennent :
  - Plusieurs sites actifs identiques ;
  - Plusieurs sites allostériques identiques.
- Cette régulation est définie par:
  - **L'effet allostérique:**
    - un système multi-enzymatique, l'enzyme clé (catalysant l'étape d'engagement d'une voie métabolique) est inhibé par le produit final de cette voie : Rétro-contrôle .
    - Les effets allostériques sont les interactions indirectes entre sites de fixation distincts.
  - **Les effecteurs allostériques:**
    - Sont des ligands dont le site de fixation est différent du site de fixation du substrat .
    - Si le ligand est la molécule de substrat: **Effet allostérique homotrope** .
    - Si le ligand est une molécule différente: **Effet allostérique hétérotrope**.
  - **La transition allostérique:**
    - Enzyme allostérique: structure protéique avec au moins 2 sites fonctionnels
      - Site actif: Substrat
      - Site allostérique: Effecteur allostérique



**Figure 21 : Site actif et site allostérique**

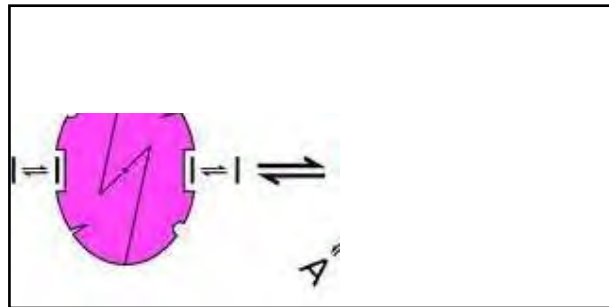


- La combinaison de l'effecteur allostérique entraîne une modification structurale discrète réversible au niveau de l'enzyme: **Transition allostérique**  $\Rightarrow$  Modification de la conformation du SA  
Modification de l'activité de l'enzyme.
- La transition allostérique modifie les forces de liaisons qui associent les sous unités entre elles, mais sans aller jusqu'à leur dissociation .

La molécule apparait soit dans un état Tendu ou relâché, qui diffère par leur affinité au substrat :

T: Faible affinité pour S

R: Forte affinité pour S



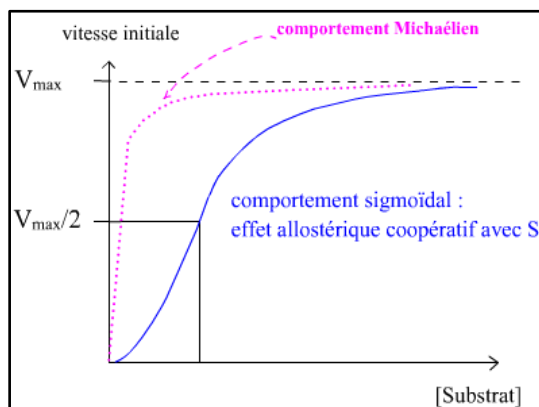
**Figure 22 : la transition allostérique**

### ▪ La coopérativité

- L'enzyme allostérique contient plusieurs sites actifs identiques Plusieurs sites allostériques identiques
- Ces sites n'agissent pas de façon indépendante l'un par rapport à l'autre, mais au contraire ils montrent une coopérativité :
- La coopérativité traduit que la fixation sur l'enzyme d'un effecteur allostérique, influe sur la fixation du substrat.
- 

### 2-Cinétique des enzymes allostériques :

- Cinétique selon une représentation de Hill



**Figure 23 : Présentation de Hill**

#### **Courbe sigmoïde**

$$V = \frac{V_m \cdot [S]^n}{K_{1/2} + [S]^n}$$

$$V = V_{max}/2 \quad K_{1/2} = [S]$$

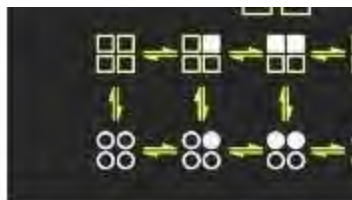
n: nombre de site de liaison de substrat

2 modèles sont décrits:

### 1- Modèle symétrique:

- Toutes les enzymes sont soit en conformation T (absence du substrat), soit en conformation R (en présence du substrat)
- Chaque molécule de substrat qui se lie augmente la probabilité de transition de la forme inactive à la forme active

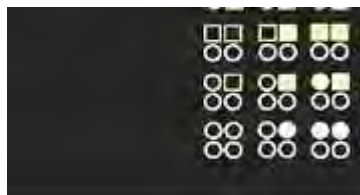
**Figure 24 :** Modèle symétrique des enzymes allostériques



### 2- Modèle séquentiel:

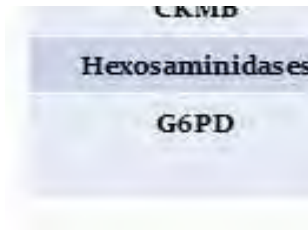
- Il y a 2 conformations, mais les sous unités passent de la forme inactive à la forme active individuellement
- La fixation de la molécule de substrat, induit la transition de la première s/u, ce qui facilite la transition de la s/u voisine et ainsi de suite.
- 

**Figure 24 :** Modèle séquentiel des enzymes allostériques



## **IX- APPLICATION DE L'ENZYMOLOGIE**

### **1- Application diagnostique-Pronostique :**



### **2- Application industrielle :**

- Evaluer la qualité des aliments.
- Vérification des processus de stérilisation et de pasteurisation.
- Synthèse d'hormones, et de médicaments.

### **3- Application thérapeutique :**

Utilisation des anti-métabolites en chimiothérapie anticancéreuse (5 FU)

### **4- Application génétique :**

- Utilisation des enzymes pour les réactions d'amplification in vitro .
- Utilisation des enzymes de restriction pour le diagnostic de certaines maladies génétiques .